Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen über den Abbau des ^{3}H-Desoxycytidins durch HeLa-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Rüdiger Rathenberg
aus Königsberg/Pr.

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen über den Abbau des ^{3}H-Desoxycytidins durch HeLa-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Rüdiger Rathenberg
aus Königsberg/Pr.

Marburg 1968

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg am 9. Juli

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr. med. R. Siegert
Referent: Dozent Dr. med. D. Müller
Correferent: Professor Dr. med. R. Siegert

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Allgemeine Methodik	8
I. Zellzüchtung	8
II. Die Trennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte	8
a) Einengung des Mediums	8
b) Hochspannungselektrophoretische Auftrennung	9
c) Papierchromatographische Auftrennung	11
d) Messung der ^{3}H-Aktivität	16
III. Trennung der Desoxycytidylsäure und der Thymidylsäure der DNS	16
a) Extraktion der DNS	17
b) Enzymatischer Abbau der DNS	18
c) Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der beiden Pyrimidindesoxyribotide	19
C. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	20
I. Der Abbau des Desoxycytidins durch die HeLa-Zellen	20
a) Durchführung des radioaktiven Versuches	20

b) Die Bestimmung der Generationszeit 22

c) Zellzählungen 23

d) Volumenkorrektur 27

e) Korrektur der spezifischen Aktivität der ^{3}H-CdR-Abbauprodukte 27

f) Ergebnisse des Abbauversuches 28

II. Die Verwertung des Desoxycytidins für die Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure der DNS 32

D. Diskussion 34

E. Zusammenfassung 44

F. Literatur 47

A. EINLEITUNG

In der Desoxyribonukleinsäure sind im wesentlichen vier Desoxyribonukleotide enthalten, deren basische Komponenten Derivate des Purins und Pyrimidins sind. Von den hier interessierenden Pyrimidin-Desoxyribonukleosiden Thymidin (TdR) und Desoxycytidin (CdR), die als fertige Vorläufer für die DNS-Synthese in Betracht kommen, ist bisher nur dem TdR besondere Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Das TdR wird direkt für die DNS-Synthese verwertet, was autoradiographische und biochemische Untersuchungen an pflanzlichen und tierischen Organismen beweisen (Literatur siehe bei FRIEDKIN und WOOD, 1956; TAYLOR, 1960a, b; RACHMELER, GERHARDT und ROSNER, 1961). Es kann als ein spezifischer Vorläufer der DNS bezeichnet werden. AMANO, MESSIER und LEBLOND (1958) konnten durch autoradiographische Untersuchungen an Geweben der Ratte nach ^{3}H-TdR-Verabreichung und durch DNase-Behandlung zeigen, daß das TdR ausschließlich ein Vorläufer der DNS ist. Untersuchungen gleicher Art an HeLa-Zellen führten zu entsprechenden Ergebnissen (MÜLLER, 1966).

Bei der Verabreichung von TdR in vitro oder in vivo wird die natürliche Vorläufersynthese nicht völlig eingestellt; vielmehr ist verabreichtes TdR nur zu einem gewissen Teil an der Neubildung von DNS-TdR beteiligt. Die Größe dieses Anteiles ist abhängig von der Konzentration des TdR im Serum bzw. in der Kulturflüssigkeit (STEWART, QUASTLER et al. 1965; LANG, PILGRIM und MAURER, 1966; LANG, MÜLLER und MAURER, 1967).

Das TdR wird jedoch nicht ausschließlich für die DNS-Synthese verwertet, sondern zum Teil rasch abgebaut, was Untersuchungen an menschlichen Leukozyten (MARSH und PERRY, 1964; COOPER und MILTON, 1964), an Ascites-Tumorzellen (JAQUEZ, 1962; ZAJICEK, BERNSTEIN und ROSIN, 1963) sowie an Mäusethymozyten (COOPER und MILTON, 1964) ergaben. Als Abbauprodukte wurden dabei das Thymin, das Dihydrothymin und die ß-Ureidoisobuttersäure gefunden. Ebenso vermögen HeLa-Zellen das TdR zu Thymin und ß-Ureidoisobuttersäure abzubauen, wobei das Dihydrothymin als Zwischenprodukt nur in Spuren auftritt (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966).

Die ersten Untersuchungen mit radioaktiv-markiertem CdR wurden von REICHARD und ESTBORN (1951) durchgeführt. Sie verabreichten Ratten verschiedener Altersgruppen ^{15}N-markiertes CdR und untersuchten die Radioaktivität der Nukleotide der aufgeschlossenen DNS. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß CdR nicht nur für DNS-Cytosin, sondern auch für DNS-Thymin utilisiert wird, und zwar in einem Verhältnis von etwa 1:0,6. In der RNS, die unter den gleichen Bedingungen untersucht wurde, konnte keine Radioaktivität nachgewiesen werden. Hieraus wurde der Schluß gezogen, daß das CdR nicht für die RNS utilisiert wird und die Ribosereduktion irreversibel sei (REICHARD und ESTBORN, 1951).

Im Gegensatz hierzu ist das Cytidin nicht als ausschließlicher Vorläufer der RNS anzusehen, vielmehr wird es auch für die DNS utilisiert, wie REICHARD (1959) bei Untersuchungen mit ^{14}C-Cytidin an Hühnerembryonalzellen zeigen konnte. Schematisch veranschaulicht ergibt sich hierbei der folgende Reaktionsweg:

Cytidin —— CMP —— dCMP —— DNS

Untersuchungen über den Abbau des CdR wurden bisher lediglich von SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) durchgeführt. Sie inkubierten Hepatoma-Zellen in Ascitesflüssigkeit mit 2-^{14}C-CdR; sie führten ihre Untersuchungen jedoch nur über einen Zeitraum von 60 Minuten aus. Als Abbauprodukte fanden sie Desoxyuridin (UdR) und Uracil sowie in geringen Mengen TdR und Thymin. SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) gelang es, in den Hepatoma-Zellen eine wirksame Desoxycytidyl-Desaminase nachzuweisen. Hieraus zogen sie den Schluß, daß sich der Abbau des CdR in der folgenden Weise vollziehen müsse:

CdR —— dCMP —— dUMP —— UdR + P.

MALEY und MALEY (1963) untersuchten das Inkorporationsverhältnis DNS-Cytosin : DNS-Thymin nach Inkubation mit 2-^{14}C-CdR an Hühnerembryonalzellen und fanden, daß das CdR gegenüber seiner Verwertung für das DNS-Cytosin in zweifach stärkerem Maße für das DNS-Thymin utilisiert wird. Bei vorangehenden Untersuchungen hatten MALEY und MALEY (1961) festgestellt, daß einige Tumoren, z.B. Dunning-, Morris 5123 B-, und Novikoff-Hepatoma, auch eine Desoxycytidin-Desaminase bilden. Daher nehmen MALEY und MALEY (1961; 1963) an, daß zunächst eine

Desaminierung und erst anschließend eine Phosphorylierung des Vorläufers erfolge und sich die Utilisation des CdR für das DNS-Thymin demnach vorwiegend auf dem Wege CdR —— UdR —— dUMP —— TMP vollziehe.

MALEY und MALEY (1963) untersuchten unter anderem den Einfluß des nicht markierten TdR auf die 2-^{14}C-dCMP-Inkorporation bei Hühnerembryonalzellen in vitro. Sie stellten dabei fest, daß hierdurch die Verwertung des 2-^{14}C-dCMP als DNS-Thymin reduziert wird. Umgekehrt löste eine Zugabe von nicht markiertem CdR bei einer Inkubation mit radioaktiv-markiertem TdR keinen hemmenden Einfluß auf dessen Einbau in die DNS aus (MALEY und MALEY, 1963). Unabhängig von der CdR-Zugabe wird also das TdR für die DNS-Synthese verwertet. Dieses Ergebnis wird auch durch autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-TdR an HeLa-Zellen bestätigt (MÜLLER, 1966). Dabei konnte jedoch gezeigt werden, daß CdR neben TdR gleichzeitig meßbar für die DNS-Thymidylsäure utilisiert wird, wenn man es in höherer Konzentration als das TdR verabreicht.

CMP = Cytidin-5'-monophosphat, dCMP = Desoxycytidin-5'-monophosphat, dUMP = Desoxyuridin-5'-monophosphat

Oben wurde darauf verwiesen, daß REICHARD und ESTBORN (1951) eine Utilisation des CdR lediglich für die DNS, nicht jedoch für die RNS fanden. MÜLLER (1966) konnte im Gegensatz hierzu durch vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-TdR und ^{3}H-CdR an HeLa-Zellen nachweisen, daß das CdR nicht ausschließlich für die DNS, sondern auch für die RNS verwertet wird. Nach ^{3}H-CdR-Inkubation ließen nicht nur die in der DNS-Synthese befindlichen Zellen, deren Prozentsatz durch ^{3}H-TdR-Inkubation bestimmt wurde, eine Markierung erkennen, vielmehr waren auch über fast allen übrigen Kernen Silberkörner zu finden. Durch DNase-Behandlung konnte die ^{3}H-Aktivität nach der ^{3}H-TdR-Inkubation fast vollständig beseitigt werden, was nach der ^{3}H-CdR-Inkubation nicht möglich war. Ebenso konnte später durch autoradiographische Untersuchungen nach RNase-Behandlung (MÜLLER und ROCKER, 1967) die Utilisation des CdR für die RNS bestätigt werden. Das Ausmaß der Verwertung für die RNS erwies sich dabei als von der Konzentration abhängig. Die Verwertung des CdR für die RNS erfolgt sehr wahrscheinlich über das Abbauprodukt Uracil (MÜLLER, 1966).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Abbau des ^{3}H-CdR durch HeLa-Zellen zu untersuchen und zu bestimmen, in welchem Verhältnis das CdR für das DNS-Thymin und das DNS-Cytosin utilisiert wird.

B. ALLGEMEINE METHODIK

I. Zellzüchtung

Sämtliche Untersuchungen erfolgten an HeLa-Zellen (Laborstamm MH 5). Die Zellen wurden in Roux-Flaschen in Eagles-Basal-Medium gezüchtet. Dieses enthielt 10 % Kälberserum, 0,5 % Lactalbuminhydrolysat, 0,056 % Natriumbicarbonat sowie Penicillin (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Bei der Durchführung der aktiven Versuche fand das gleiche Medium, jedoch ohne Zusatz von Kälberserum und Lactalbuminhydrolysat Verwendung. Die Zellen wurden regelmäßig in einem 3-4 Tage-Zyklus neu ausgesät und bei einer Temperatur von $37 \pm 0{,}2^{\circ}C$ gehalten. Die Zellzahl pro Volumeneinheit bei der Aussaat der Zellen wurde durch Zellzählungen in einer "Neubauer"-Kammer bestimmt.

II. Die Trennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte

a) Einengung des Mediums

Zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der ^{3}H-CdR-Inkuba-

tion wurden jeweils 5,0 ml der Kulturflüssigkeit aus den einzelnen Roux-Flaschen abpipettiert und hiervon 2,0 ml zur Auftrennung des CdR und seiner Abbauprodukte verwandt, die in 25 ml Kölbchen eines Rotationsverdampfers eingebracht wurden. Vor dem Eindampfen kamen jeweils 0,75 ml einer wässrigen Lösung hinzu, die mit den zu untersuchenden Abbauprodukten identische, jedoch nicht radioaktiv-markierte Substanzen enthielt. Jede einzelne dieser nicht markierten Substanzen war in einer Menge von 200 µg in diesen 0,75 ml enthalten. Diese zur Identifizierung verwendeten Substanzen stammten von SIGMA-Chemical-Company, St. Louis, Mo., U.S.A. sowie von SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg.

Das Gesamtvolumen wurde bei einer Temperatur von 50°C vollständig eingedampft und der Rückstand in 0,50 ml Wasser aufgenommen. Hiervon wurden 0,025 ml mit einer "AGLA"-Mikrometer-Spritze (BURROUGHS, WELLCOME u. Co, London) auf das Papier in der Hochspannungselektrophorese aufgetragen.

b) Hochspannungselektrophoretische Auftrennung

Hierfür fand das gleichfalls für die nachfolgende Papier-

chromatographie geeignete Papier 2214 ff von MACHERY und NAGEL, Düren/Westf., Verwendung. Die Blattgröße betrug 560 x 287 mm. Die Auftragstelle (AP) lag 20 cm vom rechten Blattrand (Anode) und 3 cm vom unteren Blattrand entfernt (siehe Abb. 1a, S. 12). Pufferlösung: Essigsäure-Natriumacetat-Puffer nach WALPOLE, 0,6 molar, pH 3,6, Temperatur: -2°C. Die angelegte Spannung betrug 2,4 kV und die Laufzeit ca. 1h 20'. Die Trocknung des Elektropherogramms erfolgte bei 100°C im Trockenschrank.

Die Flecken wurden mit Hilfe von UV-Licht (254 m/u) bzw. durch Anwendung von Ninhydrin zur Darstellung der ß-Aminoisobuttersäure (BAIB) identifiziert. Dabei ergab sich die in Abb. 1a dargestellte Situation: In Richtung auf die Kathode hatte sich das Cytosin (C) bewegt, das nach diesem Vorgang als einzige Substanz isoliert war, ferner CdR und BAIB, die sich noch nicht voneinander getrennt hatten. Im Bereich des Auftragspunktes lagen noch Thymin (T), TdR, U, UdR, dCMP.

TdR = Thymidin, U = Uracil, UdR = Desoxyuridin, dCMP = Desoxycytidin-5'-monophosphat, dUMP = Desoxyuridin-5'-monophosphat

Aus den Ergebnissen von Vorversuchen, bei denen die nicht radioaktiv-markierten Substanzen einzeln aufgetragen worden waren, ging hervor, daß sich die hier noch gemeinsam im Bereich des Auftragspunktes zu findenden Substanzen T, TdR, U, UdR und dCMP bereits geringfügig in Richtung auf die Anode (dCMP) bzw. auf die Kathode (T, TdR, U, UdR) bewegt hatten.

In Richtung auf die Anode waren TMP und dUMP gewandert, die sich jedoch noch nicht voneinander getrennt hatten.

Es war also eine weitere Auftrennung der verschiedenen Substanzen erforderlich, was durch Anwendung der Papierchromatographie gelang.

c) Papierchromatographische Auftrennung

Zunächst wurde das Elektropherogramm durch den Schnitt I (siehe Abb. 1a) geteilt, der 3 cm rechts vom Auftragspunkt lag.

Die im Teil A enthaltenen Substanzen (C, CdR, T, TdR, U, UdR, dCMP und BAIB) ließen sich zum größten Teil mit

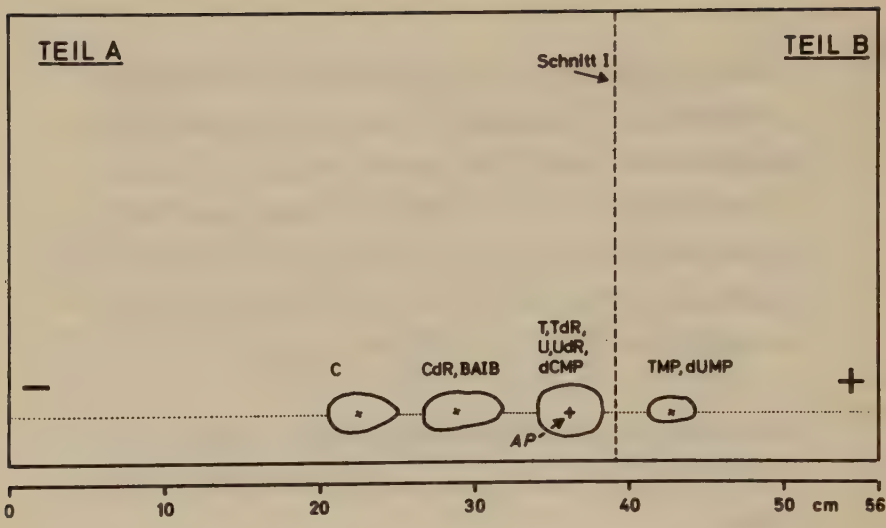

Abb. 1 a - d:

Auftrennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte durch Anwendung der Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie

Abb. 1 a: Elektropherogramm, Puffer: Essigsäure-Natriumacetat 0,6 molar, pH 3,6. Angelegte Spannung: 2,4 kV. Laufzeit: 1h u. 20'. Papier: 2214 ff von MACHERY und NAGEL, Düren/Westf. Identifizierung der Substanzflecken mit Hilfe von UV-Licht und durch Anwendung von Ninhydrin zur Darstellung von BAIB. AP = Auftragspunkt.

Ergebnis: Im Bereich des Auftragspunktes sind noch zu finden T, TdR, U, UdR, dCMP. In Richtung auf die Kathode sind gewandert C, CdR, BAIB, in Richtung auf die Anode TMP und dUMP.

Abkürzungen: C = Cytosin, CdR = Desoxycytidin, dCMP = Desoxycytidin-5'-monophosphat, T = Thymin, TdR = Thymidin, TMP = Thymidin-5'-monophosphat, U = Uracil, UdR = Desoxyuridin, dUMP = Desoxyuridin-5'-monophosphat, BAIB = ß-Aminoisobuttersäure.

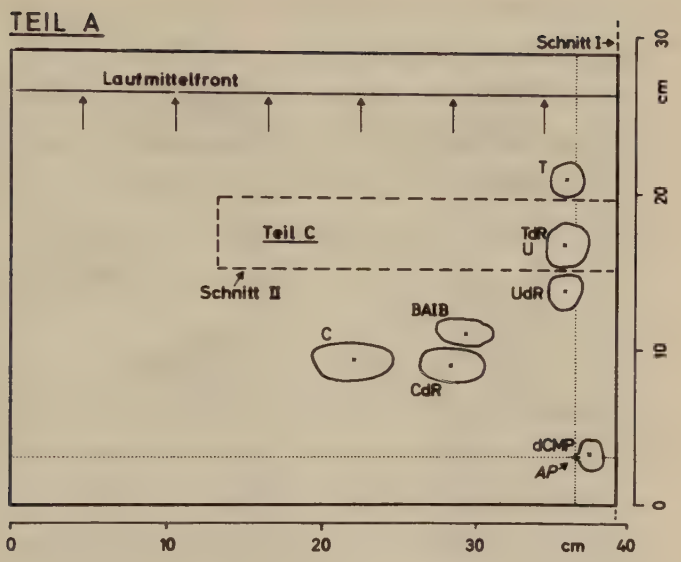

Abb. 1 b:

Papierchromatographie

Durch Schnitt I (siehe Abb. 1 a S. 12) abgetrennter Teil A des Elektropherogramms. Aufsteigendes System. Laufmittel: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 10 : 30, v/v, obere Phase.

Ergebnis: Außer TdR und U sind alle Substanzen getrennt.

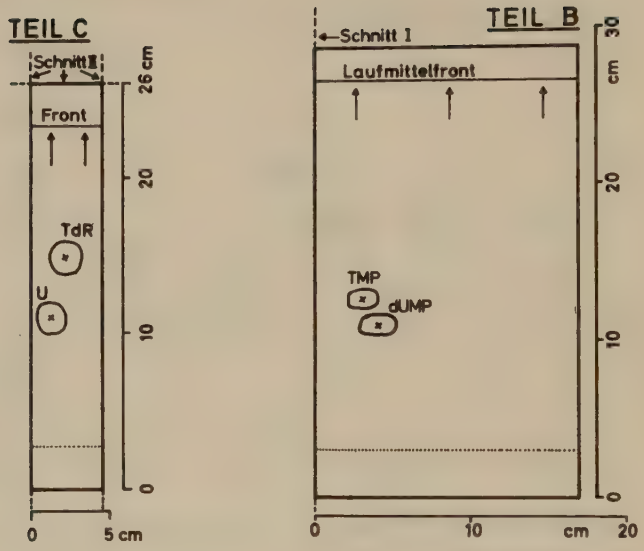

Abb. 1 c: Papierchromatographie

Durch Schnitt II herausgetrennter Teil C (siehe Abb. 1 b, S. 13). Aufsteigendes System. Laufmittel: Butanol-1, wassergesättigt.

Abb. 1 d: Papierchromatographie

Durch Schnitt I abgetrennter Teil B des Elektropherogramms (siehe Abb. 1 a, S. 12). Aufsteigendes System. Laufmittel: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 13 : 27, v/v, obere Phase.

dem Laufmittel = Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 10 : 30, v/v, (obere Phase) trennen. Nach der Trocknung zeigte sich die in Abb. 1b (siehe S. 13) dargestellte Situation: Sämtliche hier vorhandenen Substanzen, mit Ausnahme von U und TdR, waren voneinander getrennt. Eine weitere Auftrennung von U und TdR war deshalb erforderlich.

Wie in Abb. 1b dargestellt, wurde der das TdR und U enthaltende Teil des Chromatogramms durch den Schnitt II herausgetrennt (= Teil C). Die chromatographische Entwicklung erfolgte wiederum in einem aufsteigenden System, und zwar mit Butanol-1, wassergesättigt. Auf diese Weise konnten, wie aus Abb. 1c (siehe S. 14) hervorgeht, die beiden Substanzen getrennt werden.

Für die im Teil B des Elektropherogramms (Abb. 1a) enthaltenen Substanzen TMP und dUMP stellte sich folgendes Laufmittel als geeignet heraus: Essigsäureäthylester : Wasser : Ameisensäure = 60 : 27 : 13, v/v, (obere Phase). Auch hier wurde die aufsteigende Chromatographie angewandt. Die Abb. 1d zeigt das Ergebnis: TMP und dUMP konnten auf diese Weise getrennt werden.

d) Messung der ^{3}H-Aktivität

Die mit Hilfe von UV-Licht bzw. durch Anwendung von Ninhydrin sichtbar gemachten Substanzflecken wurden mit Bleistift umrandet. Danach wurden rechteckige bzw. quadratische Bereiche, innerhalb deren Grenzen die identifizierten Flecken lagen, in 2 mal 2 cm große Quadrate aufgeteilt und ausgeschnitten. Diese Quadrate wurden flach auf den Boden von Probenfläschchen eines Flüssigkeitsszintillationszählers gelegt und mit Szintillationsflüssigkeit überschichtet, die folgende Zusammensetzung hatte: 6,0 g PPO; 0,10 g POPOP; 1 l Toluol. Das eingefüllte Volumen betrug 15 ml. Die Messungen wurden durchgeführt mit dem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer Modell 6860, "MARK I" der Firma NUCLEAR CHICAGO.

III. Trennung der Desoxycytidylsäure und der Thymidylsäure der DNS

Die Trennung dieser beiden Mononukleotide wurde durchgeführt, um festzustellen, in welchem Verhältnis verabreichtes CdR als Desoxycytidylsäure bzw. als Thymidyl-

säure für die DNS utilisiert wird. Hierzu waren erforderlich: a) die Extraktion der DNS aus dem Zellmaterial, b) die enzymatische Hydrolyse der DNS, c) die hochspannungselektrophoretische Auftrennung der beiden Mononukleotide.

a) Extraktion der DNS

Die Extraktion der DNS erfolgte nach der Methode von SCHNEIDER (1945) (siehe auch DOMAGK, 1964). Aus den Roux-Flaschen geernteten Zellen wurden zentrifugiert und die Sedimente in etwa dem 5-fachen Volumen Wasser aufgeschwemmt. Die Homogenisierung geschah durch Anwendung von Ultraschall. Zu dem Zell-Homogenat wurde 10 %ige, eisgekühlte Trichloressigsäure (TCE) im Verhältnis 1 : 2 hinzugefügt. Nach der Zentrifugation wurde der Waschvorgang dreimal mit eisgekühlter 5 %iger TCE wiederholt. Nachdem auf diese Weise die säurelöslichen Bestandteile aus den Zellen entfernt waren, erfolgte die Extraktion der DNS durch Hydrolyse des Sediments in 5 %iger TCE bei einer Temperatur von 90°C (15'). Danach wurde zentrifugiert und das Sediment nochmals mit 5 %iger TCE gewaschen. Die die DNS enthaltenden Überstände wurden vereinigt. Nach Durchführung der Diphenylamin-Reaktion

(DISCHE, 1930) erfolgte die photometrische Bestimmung der DNS-Menge.

b) Enzymatischer Abbau der DNS

Der enzymatische Abbau der DNS erfolgte in zwei Schritten, zunächst durch eine DNase-Behandlung, nachfolgend durch eine Phosphodiesterase-Behandlung nach der Methode von COHN (1957) (siehe auch DOMAGK, 1964).

Es wurde von einem Volumen von 15 ml ausgegangen. Dieses enthielt 0,03 % DNS, 0,03 % DNase (Desoxyribonuklease I, krist. reinst, 90 000 Dornase-E/mg, SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg) sowie 0,04 m Mg^{++}. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und bei einem pH von 7,4 im Autotitrator (Typ TTTic "RADIOMETER", Kopenhagen).

Nach Beendigung der DNase-Behandlung (ca. 2 Std.) wurde durch Zugabe von 1/100 n NaOH der pH 8,4 eingestellt und Phosphodiesterase in einer Konzentration von 2,4 mg/ml hinzugefügt. Die Phosphodiesterase war säulenchromatographisch (Cellulosepulver MN 2100, MACHERY und NAGEL, Düren/Westf.) aus Schlangengift (SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg) gewonnen (HEIDELBERGER,

HARBERS et al., 1956; HURST und BUTLER, 1951) und gefriergetrocknet aufbewahrt worden.

c) Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der beiden Pyrimidindesoxyribotide

Das nach Beendigung der enzymatischen DNS-Hydrolyse vorliegende Gesamtvolumen wurde im Rotationsverdampfer bei 50°C auf etwa 5 ml eingeengt. Hiervon sind etwa 0,05 ml auf das Papier in der Hochspannungselektrophorese aufgetragen worden. An der Auftragsstelle wurden die nicht radioaktiv-markierten Vergleichssubstanzen TMP und dCMP in einer Menge von jeweils 10 µg hinzugefügt.

Die Auftrennung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Auftrennung des CdR und seiner Abbauprodukte. Die Identifizierung geschah mit Hilfe von UV-Licht. Die Flecken wurden in gleicher Weise ausgeschnitten und die Aktivitäten im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

C. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

I. Der Abbau des Desoxycytidins durch die HeLa-Zellen

Für diese Untersuchungen wurden insgesamt 16 Roux-Flaschen verwendet. Die Aussaat der Zellen erfolgte 3 Tage vor Versuchsbeginn aus einer homogenen Zellsuspension (100 ml/Roux-Flasche), wobei besonders auf die exakte Einfüllung gleicher Volumina geachtet wurde. Die Erneuerung der Kulturflüssigkeit erfolgte am 2. Tag nach dem Ansatz.

a) Durchführung des radioaktiven Versuches

Nach Abgießen des Kulturmediums wurde der Zellrasen zunächst vorsichtig mit HANKS "BSS" (37°C) gespült. Danach erhielten sechs Roux-Flaschen jeweils genau 80 ml ^{3}H-CdR-haltigen Mediums. Die Zusammensetzung des Mediums entsprach dem "Versuchsmedium" (siehe allg. Methodik) und enthielt somit kein Kälberserum. Die Aktivität des verabreichten ^{3}H-CdR-(G) (NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION, Boston, Mass., U.S.A., spezifische Aktivität 991 mC/mMol) betrug 1,02 /uC/ml Medium.

Durch Zugabe von inaktivem CdR (SIGMA-Chemical-Company, St. Louis, Mo., U.S.A.) war die spezifische Aktivität auf 295 mC/mMol herabgesetzt worden. Die CdR-Konzentration betrug demnach 0,782 ug/ml. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn (20', 40', 80', 150', 4h, 6h, 8h) wurden jeweils 5 ml des Mediums entnommen und der prozentuale Anteil des CdR und seiner Abbauprodukte sowie die Gesamtaktivität des Mediums und deren nichtflüchtige Anteile bestimmt.

Zur Bestimmung des Prozentsatzes des CdR und seiner Abbauprodukte erfolgte die Aufarbeitung des Mediums in der oben (siehe allg. Methodik) beschriebenen Weise. Das CdR und seine Abbauprodukte UdR, Uracil und Cytosin wurden durch die Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie getrennt. Durch Messungen der ^{3}H-Aktivität dieser isolierten Substanzen wurde dann deren relative Aktivität im Medium ermittelt.

Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Gesamtaktivität sowie der Menge der nicht-flüchtigen Aktivität des Mediums zu verschiedenen Entnahmezeiten. Zur Messung der nicht flüchtigen Aktivität wurden jeweils von

den abpipettierten 5 ml des Mediums 5 x 50 /ul entnommen, in Meßküvetten eingebracht und gefriergetrocknet. Nach Auflösung des Rückstandes in 0,45 ml Wasser und Zugabe der Szintillationsflüssigkeit erfolgte die Aktivitätsmessung im Szintillationszähler. Die Gesamtaktivität wurde auf die gleiche Weise gemessen, jedoch ohne eine vorausgegangene Gefriertrocknung.

b) Die Bestimmung der Generationszeit

Die zu den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Versuchszeitraumes ermittelten relativen ^{3}H-Aktivitäten des CdR und seiner Abbauprodukte, wie auch der Gesamtaktivität und der nicht-flüchtigen Aktivität des Mediums, bedürfen verschiedener Korrekturen. Unter anderem ist zu berücksichtigen, daß während der Versuchsdauer von 8 Stunden eine Zunahme der Zellzahl stattgefunden hat. Um die ermittelten Werte auf eine gleichbleibende Zellzahl beziehen zu können, war die Bestimmung der Generationszeit erforderlich. Diese erfolgte einmal durch die Zellzählung zu Versuchsbeginn und am Ende der Versuchszeit, andererseits durch Ermittlung des ^{3}H-Index.

c) Zellzählungen

Zur Ermittlung der Zellzahl zu Versuchsbeginn wurden vier Roux-Flaschen aus dem gleichen Ansatz verwendet. Die Ernte erfolgte mit Hilfe von Versenlösung.

Gleichzeitig erhielten zum Zeitpunkt Null weitere vier Roux-Flaschen unter den gleichen Bedingungen wie im radioaktiven Versuch nach der Spülung mit HANKS "BSS" 80 ml Kulturflüssigkeit, die nicht radioaktiv-markiertes CdR in der gleichen Konzentration enthielt. Diese wurden zur Bestimmung der Zellzahl zu Versuchsende verwendet. Von den 80 ml des Mediums wurden während der Versuchszeit von 8 Stunden zu den gleichen Zeiten wie im radioaktiven Versuch auch je 5 ml Medium entnommen und verworfen, wodurch gleiche Volumen- und Konzentrationsverhältnisse gewährleistet waren. Am Ende der Versuchszeit erfolgte die Ernte der Zellen ebenfalls mit Versen. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl geschah durch Zählung in der "NEUBAUER"-Kammer, getrennt für jede einzelne Roux-Flasche.

Die Ergebnisse der Zellzählung waren:

$$0h: 3{,}19 \times 10^7 \quad (s = \pm 0{,}34)$$

$$8h: 4{,}29 \times 10^7 \quad (s = \pm 0{,}26)$$

Aus diesen Zellzahlen kann die Generationszeit (T) berechnet werden. Im Stadium der exponentiellen Vermehrung der HeLa-Zellen nimmt ihre Gesamtzahl zu entsprechend der Formel:

$$\text{I.} \quad Z_t = Z_o \times 2^{\frac{t}{T}} \quad \text{(nach LENNARTZ und MAURER, 1964)}$$

Dabei bedeuten: Z_o die Zahl der Zellen zur Zeit 0, Z_t die Zahl der Zellen zum Zeitpunkt t der laufenden Versuchszeit und T die Generationszeit. Hierunter ist der Zeitraum zu verstehen, in dem eine Zelle sämtliche Phasen des Generationszyklus, einschließlich der Mitose, durchläuft. Innerhalb dieser Zeitspanne tritt also auch die Verdoppelung der Einzelzelle ein. Auf eine Population übertragen bedeutet das, daß innerhalb T sämtliche Zellen - hier jedoch nicht synchron - den Zellzyklus einschließlich der Mitose durchlaufen. Folglich wird innerhalb dieser Zeit auch eine Verdoppelung der Gesamtzellzahl eintreten.

Die Formel (I) kann nach T aufgelöst werden:

$$\text{II.} \quad T = \frac{t \times \log 2}{\log \frac{Z_t}{Z_o}}$$

Bei bekanntem t (= 8h) sowie Z_t (= $4{,}29 \times 10^7$) und Z_o (= $3{,}19 \times 10^7$) ist T zu berechnen. T beträgt im vorliegenden Falle 18,2 Stunden.

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, die Zellzahl zu einem beliebigen Zeitpunkt t innerhalb der Versuchszeit von 8 Stunden zu ermitteln. Die Berechnung ist möglich nach Formel I, da Z_o und T bekannt sind.

Die Umrechnung der gewonnenen Ergebnisse (prozentuale Relation des CdR und seiner Abbauprodukte im Medium) wurde mit Hilfe eines Faktors vorgenommen, der sich aus der mittleren Zellzahl zwischen den Entnahmezeiten und Z_o ergab.

Wie oben bereits erwähnt, kann auch aus dem Prozentsatz der markierten Kerne (= ^{3}H-Index) die Generationszeit (T) berechnet werden, wenn die Dauer der konstanten Teilphasen (der DNS-Synthese-Phase, der G_2-Phase und der Mitose-Phase) bekannt ist. Von MÜLLER (1967) wurden die Dauer der Teilphasen bei HeLa-Zellen untersucht und die Beziehungen sowohl zwischen dem Prozentsatz der in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne bzw. dem ^{3}H-Index als auch der Dauer der Generationszeit berechnet.

Zwei weitere Roux-Flaschen wurden zum Zeitpunkt Null ebenfalls mit "BSS" gespült und erhielten Versuchsme-

dium, das inaktives CdR in gleicher Konzentration enthielt wie im radioaktiven Versuch. Auch hier wurden zu verschiedenen Entnahmezeiten jeweils 5 ml des Mediums entnommen und verworfen. Etwa 5 Stunden nach Versuchsbeginn wurde das Medium gewechselt. Die Roux-Flaschen erhielten ^{3}H-TdR-haltiges Versuchsmedium (0,1 uC/ml; spezifische Aktivität 5000 mC/mMol). Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Danach wurden die Zellen durch kurzzeitige Anwendung von Versenlösung geerntet. Das durch Zentrifugation gewonnene Zellsediment der beiden Roux-Flaschen wurde mit Alkohol-Eisessig (3:1, v/v) fixiert und anschließend auf Objektträger aufgetropft. Nach Waschen mit TCE (5 %ig) und inaktiver TdR-Lösung (0,5 mg/ml) erfolgte Herstellung von Autoradiogrammen sowie deren Färbung mit Hämatoxylin (nach BÖHMER) und Eosin. Der Prozentsatz markierter Zellen wurde durch Auszählung von jeweils 2 000 Zellen/Roux-Flasche bestimmt.

Aus den ermittelten ^{3}H-Indices von 45,0 bzw. 45,5 ergibt sich eine Generationszeit von 19,0 bzw. 19,2 Stunden. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit jenen, die aus den Ergebnissen der Zellzählung errechnet wurden.

d) Volumenkorrektur

Infolge der Entnahme von jeweils 5 ml der Kulturflüssigkeit zu den verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn änderte sich das Verhältnis der Zellzahl zum Volumen. Diese Tatsache wurde berücksichtigt, indem die Ergebnisse auf ein konstantes Volumen, nämlich auf jenes zu Versuchsbeginn (80 ml) bezogen wurden.

e) Korrektur der spezifischen Aktivität der ^{3}H-CdR-Abbauprodukte

Für die Untersuchung wurde ^{3}H-CdR (G) der Firma NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION, Boston, Mass., U.S.A. verwandt. Hierbei handelt es sich um ein Präparat, das Tritium in neun verschiedenen Positionen aufweisen kann, wobei die Häufigkeit des Tritiums in den Positionen in einer statistischen Gleichmäßigkeit vorliegt. Wasserstoff kann überall dort gegen Tritium ausgetauscht sein, wo eine direkte Bindung an ein C-Atom besteht. Tritium ist demnach in sieben verschiedenen Positionen des Desoxyriboseanteils und in zwei Positionen (4 und 5) der Base zu finden.

Der Abbau des CdR kann den Verlust verschiedener ^{3}H-Atome zur Folge haben. Die spezifische Aktivität einiger Abbauprodukte kann deshalb geringer sein als die der Ausgangssubstanz CdR. So verhält sich z.B. die spezifische Aktivität des Abbauproduktes Cytosin infolge des Verlustes der Tritiumatome im Desoxyriboseanteil gegenüber der des CdR wie 1:4,5. Zur Bestimmung des Prozentsatzes des CdR und seiner Abbauprodukte im Medium mußte daher die für die einzelnen Substanzen gemessene ^{3}H-Aktivität korrigiert werden.

f) Die Ergebnisse des Abbauversuches

Sämtliche Ergebnisse, Gesamtaktivität des Mediums, nicht-flüchtige Aktivität sowie die relativen Aktivitäten des CdR und seiner Abbauprodukte sind in der Abbildung 2 (siehe S. 31) als Funktion der Zeit dargestellt. Diese Darstellung wurde angefertigt nach den durchgeführten Korrekturen. Die Werte beziehen sich demnach auf eine konstante Zellzahl, die der zu Versuchsbeginn gegebenen entspricht, also auf eine "steady-state-Situation". Sie beziehen sich weiterhin auf ein konstantes Volumen der Kulturflüssigkeit von

80 ml. In der Darstellung wurden die Abbauprodukte UdR, Uracil und Cytosin berücksichtigt. Auf die Darstellung der Einzelwerte des Cytosin ist verzichtet worden. Die Einzelmessungen zeigten zu den verschiedenen Zeitpunkten keine größeren Abweichungen als sie bei den Abbauprodukten UdR und Uracil gefunden wurden.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die ^{3}H-CdR-Konzentration sehr rasch abnimmt. Der 50 %-Wert ist bereits nach etwa 15 Minuten erreicht. Nach 40 Minuten beträgt der Anteil des CdR noch etwa 5 %, nach $2\frac{1}{2}$ Stunden nur noch ca. 2 %. Ein geringer Teil bleibt auch in den nachfolgenden Stunden bis zum Versuchsende noch nachweisbar. Ebenso rasch, wie die Menge des CdR abnimmt, nimmt die des UdR in den ersten Minuten zu. Nach etwa 40 Minuten hat der Anteil des UdR mit ca. 40 % auch sein Maximum erreicht. Danach nimmt die Menge des UdR langsam,aber kontinuierlich ab. Sein Anteil an den untersuchten Substanzen beträgt nach $2\frac{1}{2}$ Stunden ca. 25 %, nach 4 Stunden 18 % und am Versuchsende schließlich 6 %. Weniger schnell als das UdR tritt Uracil in der Kulturflüssigkeit auf. Nach 80 Minuten ist es mit etwa 35 % an den nachgewiesenen Substanzen

beteiligt. Seine Zunahme wird im Verlauf der nächsten Stunden geringer, doch stellt es mit ca. 70 % am Versuchsende den Hauptanteil sämtlicher Abbauprodukte. Auch das Cytosin tritt später in Erscheinung. Nach 40 Minuten macht sein Anteil knapp 8 % aus; danach ist ein geringer Abbau auf etwa 5 % festzustellen. Diese Menge bleibt bis zu Versuchsende vorhanden.

Die Gesamtaktivität des Mediums nimmt im Verlauf der ersten 40 Minuten sehr rasch um ca. 5 % ab. Danach ist nur noch eine geringe Abnahme festzustellen. Zu Versuchsende beträgt sie noch ca. 94 % der Aktivität zu Versuchsbeginn.

Ähnliche Verhältnisse liegen bei der nicht-flüchtigen Aktivität vor. In den ersten 20 Minuten des Versuches werden etwa 7 % der Aktivität flüchtig; nach 40 Minuten beträgt die nicht-flüchtige Aktivität ca. 91 % der Ausgangsaktivität. Von diesem Zeitpunkt an ist nur noch eine langsame Abnahme festzustellen. Zu Versuchsende beträgt der Anteil nicht-flüchtiger Bestandteile noch ca. 83 % der Ausgangsaktivität.

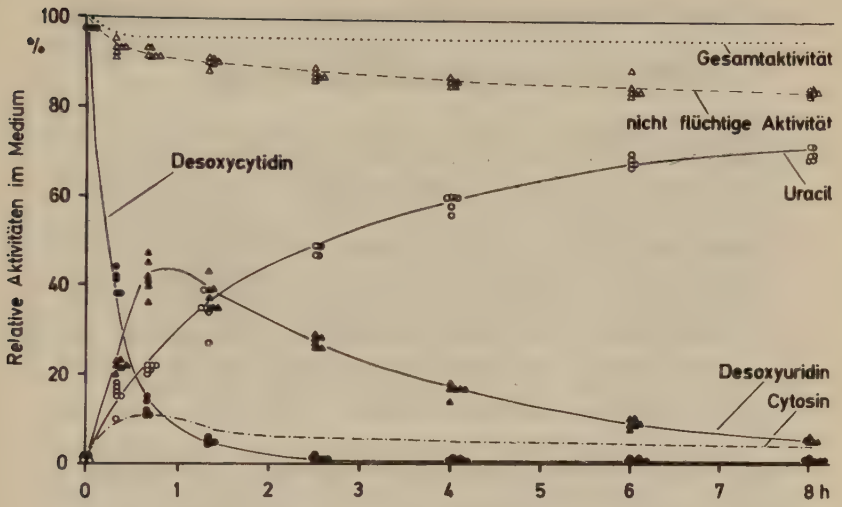

Abb. 2: Prozentuale Relation des Desoxycytidin und seiner Abbauprodukte sowie der Gesamtaktivität und der nicht-flüchtigen Aktivität in der Kulturflüssigkeit von HeLa-Zellen als Funktion der Versuchszeit.

Dauer der Inkubationszeit: 8 Stunden. Es wurden jeweils 6 Messungen durchgeführt zu den Entnahmezeiten 20', 40', 80', 150', 4h, 6h und 8 h. 80 ml Medium/Roux-Flasche. Gesamtzellzahl zu Versuchsbeginn: 3,19 x 10^7, nach 8h 4,29 x 10^7. Spezifische Aktivität des CdR: 295 mC/mMol, Konzentration des CdR: 0,782/ml. Die Darstellung sämtlicher Ergebnisse erfolgte nach Volumenkorrektur, Korrektur der spezifischen Aktivität der CdR-Abbauprodukte und nach einer Umrechnung der exponentiell zunehmenden Zellzahl auf eine "steady-state-Situation". Die Werte beziehen sich auf die Zellzahl zu Versuchsbeginn und auf 80 ml Medium.

Der raschen Abnahme des ^{3}H-CdR entspricht ein ähnlich rascher Anstieg des UdR. Späteres Auftreten von Uracil. Zu Versuchsende beträgt sein Anteil am abgebauten CdR ca. 70 %. Rasche Abnahme der Gesamtaktivität in den ersten 40'. Ähnliches Verhalten der nicht-flüchtigen Aktivität.

II. Die Verwertung des Desoxycytidins für die Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure der DNS

Um festzustellen, in welchem Verhältnis das CdR für die Desoxycytidyl- und Thymidylsäure verwertet wird, wurden HeLa-Zellen in entsprechender Weise in ^{3}H-CdR(G)-haltigem Medium inkubiert. Die Aussaat der Zellen und die Erneuerung der Kulturflüssigkeit erfolgten auf die gleiche Weise wie im oben beschriebenen Versuch.

Sechs Roux-Flaschen erhielten am 3. Tage nach dem Ansatz jeweils 70 ml Medium, das 0,57 µC ^{3}H-CdR(G) ml (spezifische Aktivität: 182 mC/mMol) enthielt. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 5 Stunden. Nach Abgießen des Mediums wurde der Zellrasen durch nachfolgendes Einfrieren vom Boden gelöst. Die Extraktion der DNS, deren enzymatischer Abbau sowie die hochspannungselektrophoretische Auftrennung der beiden Pyrimidindesoxyribotide erfolgten auf die im Abschnitt "Allgemeine Methodik" beschriebene Weise.

Die Untersuchung der ^{3}H-Aktivität der beiden isolier-

ten Substanzen ergab für Thymidylsäure 1480 cpm, für Desoxycytidylsäure 1560 cpm.

Aus den Ergebnissen kann man jedoch das Utilisationsverhältnis nicht direkt ableiten. Es ist vorher eine Korrektur erforderlich, wie aus dem oben über die Verteilung des Tritium in dem Molekül des ^{3}H-CdR(G) gesagten verständlich wird. Infolge der Methylierung des CdR auf dem Wege zum TdR wird das in Position 5 der Base vorhandene Tritium gegen eine Methylgruppe ausgetauscht, wodurch die spezifische Aktivität des TMP um $\frac{1}{9}$ gegenüber der des CdR vermindert wird. Nach der erforderlichen Korrektur ergibt sich sodann folgendes Verhältnis: TMP 1665 zu dCMP 1560. Dementsprechend wird CdR zu 51 % für Thymidylsäure und zu 49 % für die Desoxycytidylsäure der DNS verwertet.

D. D I S K U S S I O N

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den Abbau des ^{3}H-CdR durch HeLa-Zellen zu studieren und festzustellen, welche Mengen des verabreichten Vorläufers die Zellen in einer Zeiteinheit abzubauen vermögen. Ferner sollte das Verhältnis bestimmt werden, in dem CdR für das DNS-Cytosin und DNS-Thymin verwertet wird.

Bei der Untersuchung des Abbaus des CdR war zu überlegen, welche Substanzen als Abbauprodukte in Betracht kommen. Zu berücksichtigen waren sämtliche Zwischenprodukte, die auf dem Wege zur Bildung des UdR bzw. von TMP bei vorangehender Phosphorylierung und nachfolgender Desaminierung (SCHNEIDER und ROTHERHAM, 1961) oder bei der zunächst stattfindenden Desaminierung (MALEY und MALEY, 1963) auftreten können. Somit waren in die Reihe der zu untersuchenden Substanzen das dCMP, CdR, dUMP, UdR, TMP sowie auch das Uracil, das als wichtiges Abbauprodukt von SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) gefunden wurde, einzubeziehen. Ferner mußte das Cytosin in die Reihe der zu untersuchenden Substanzen aufge-

nommen werden, da seine Entstehung ebenso vorstellbar ist, wie die des Uracils.

Schließlich mußten auch diejenigen Substanzen berücksichtigt werden, die wiederum beim Abbau des TdR bzw. TMP auftreten können. Untersuchungen über den Abbau des TdR durch HeLa-Zellen (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966) hatten gezeigt, daß dieses vorwiegend zu Thymin sowie auch ß-Ureidoisobuttersäure abgebaut wird. Daher wurde zunächst auch das Thymin in den Kreis der zu untersuchenden Substanzen mit einbezogen. Auch das Vorkommen von ß-Aminoisobuttersäure (BAIB) wurde geprüft. Diese kann als ein Endprodukt des Thyminabbaus angesehen werden, wie Untersuchungen mit Methyl-^{14}C-Thymin an Ratten ergaben (FINK et al., 1956).

In Vorversuchen konnten in großen Mengen das UdR und das Uracil nachgewiesen werden. Cytosin, TMP und TdR fanden sich in geringer Menge, während von den anderen genannten Substanzen nur Spuren feststellbar waren. BAIB konnte nicht nachgewiesen werden.

Als wesentliches Ergebnis der Abbauversuche ist hervorzuheben, daß UdR und Uracil in großen Mengen auftreten, und die weiteren erwähnten Abbauprodukte hinter diesen beiden Substanzen weit zurückblieben.

Von Bedeutung erscheint die Reihenfolge des Auftretens der Abbauprodukte. Das UdR macht nach kurzer Zeit die Hauptmenge aller vorliegenden Abbauprodukte aus. Jedoch ist im weiteren Verlauf der Versuchszeit zu beobachten, daß die Menge des UdR wiederum, und zwar langsam und gleichmäßig, abnimmt. Im gleichen Zeitraum tritt in zunehmendem Maße Uracil auf. Aus diesem Ergebnis wird die Schlußfolgerung gezogen, daß nachfolgend eine Abspaltung des Desoxyriboseanteiles des UdR stattfindet und die freie Base Uracil entsteht.

Weiterhin wurde das Auftreten von Cytosin beobachtet, dessen Anteil zeitweise ca. 10 % der Abbauprodukte ausmachte. Seine Entstehung ist vorstellbar aus einer sofortigen Trennung von Cytosin und Desoxyribose des CdR.

Diese Ergebnisse sind mit den Befunden von SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961), die Hepatoma-Zellen in Ascites-

flüssigkeit mit ^{14}C-CdR inkubierten, qualitativ vergleichbar. Auch SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) konnten Uracil und UdR als sehr rasch entstehende Hauptabbauprodukte nachweisen. Da jedoch keine Angaben über Zell- und Substanzmengen gemacht werden, sind quantitative Vergleiche nicht möglich. Auch wurden die Untersuchungen nur über eine kurze Versuchszeit (1 Stunde) durchgeführt und der weitere Abbauweg des UdR nicht verfolgt. Neben UdR und Uracil wiesen SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) noch TdR und Thymin in geringer Menge nach.

Bei einer Gegenüberstellung unserer Befunde mit denen von SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) ist zu ersehen, daß dem raschen Abbau des CdR eine ähnlich rasche Bildung von UdR entspricht. Der Abbau zu Uracil wird erst später sichtbar. Weiterhin konnten auch SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) TdR und Thymin nachweisen, allerdings in größeren Mengen. Die Anteile von TdR und Thymin an den Abbauprodukten betrugen bei den HeLa-Zellen etwa 4 %.

Die Untersuchung der Gesamtaktivität des Mediums ergab, daß diese innerhalb der ersten Stunde um ca. 5 %,

danach bis zum Ende jedoch nur noch um weitere 1 % abfiel. Die "Gesamtaktivität" repräsentiert die flüchtigen, also bereits zu Wasser abgebauten und die nichtflüchtigen Bestandteile. Ihre Abnahme gibt Aufschluß über den Anteil der Aktivität, der infolge der Inkorporation durch die Zellen aus dem Medium entfernt wurde. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß sich besonders zu Beginn der Versuchszeit eine starke Inkorporation vollzieht und diese dann kontinuierlich nachläßt.

Ähnlich verhielt sich der Anteil der nicht-flüchtigen Aktivität. Nach einer zunächst raschen Abnahme um ca. 7 % vollzog sich später eine langsame, aber kontinuierliche Abnahme auf ca. 83 %. Hieraus geht hervor, daß innerhalb der Versuchszeit ca. 12 % des verabreichten CdR abgebaut wurden. Dieser Betrag ergibt sich durch Abzug der zu diesem Zeitpunkt gemessenen Minderung der Gesamtaktivität (6 %) von der Differenz, die sich aus der Gesamtaktivität zu Versuchsbeginn und der zu Versuchsende gemessenen nicht-flüchtigen Aktivität errechnet.

Eingangs wurden die möglichen Wege des Abbaus des CdR und seiner Utilisation für die Thymidylsäure erläutert. Die Utilisation des CdR für die Thymidylsäure und dessen Abbau vollzieht sich sehr wahrscheinlich vorwiegend auf dem von MALEY und MALEY (1963) angegebenen Reaktionswege CdR —— UdR (—— Uracil) —— TMP. Hierfür sprechen die großen Mengen von UdR, die zu Beginn im Versuchsmedium auftreten.

Das Utilisationsverhältnis des CdR für das DNS-Cytosin und DNS-Thymin betrug nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden annähernd 1:1. REICHARD (1959) fand nach dreistündiger Inkubation mit ^{14}C-CdR an Hühnerembryonalzellen ein fast identisches Einbauverhältnis von 1,2 : 1. Bei MALEY und MALEY (1960) betrug dieses Verhältnis nach zweistündiger Inkubation mit 2-^{14} C-CdR an gleichem Untersuchungsmaterial allerdings 1:2.

Es erhebt sich nun die Frage, ob aus den gewonnenen Werten der relativen Aktivitäten des CdR und seiner Abbauprodukte im Medium im Verlauf der Versuchszeit Schlußfolgerungen auf die Mengen des verabreichten Vorläufers gezogen werden können, die in einer Zeiteinheit

abgebaut werden. Derartige Berechnungen sind annäherungsweise möglich, wenn die während des Versuchs herbeigeführte Volumenabnahme der Kulturflüssigkeit, die ständige Zunahme der Zellzahl sowie die Veränderung der spezifischen Aktivität der Abbauprodukte gegenüber dem verabreichten Vorläufer berücksichtigt wurden.

Wie aus der Abbildung 2 hervorgeht, nimmt die relative Aktivität des CdR im Medium exponentiell ab; die in den nachfolgenden Zeiteinheiten abgebauten CdR-Mengen werden laufend geringer. Die pro Zeiteinheit abgebaute Vorläufermenge ist vornehmlich einerseits von der jeweils vorliegenden Konzentration des Vorläufers im Medium, andererseits von der jeweiligen Fähigkeit der Zellen abhängig, eine bestimmte Vorläufermenge bei einer gegebenen Konzentration abzubauen.

Wie die Meßwerte zeigen, wurde innerhalb von 15 Minuten der 50 %-Wert der relativen Aktivität des CdR im Medium erreicht. Dies bedeutet, daß innerhalb dieser Zeit etwa die Hälfte des verabreichten CdR abgebaut wurde. Im Gesamtvolumen der Kulturflüssigkeit lagen zu Versuchsbeginn $6{,}25 \times 10^{-5}$ g CdR vor. Die mittlere

Zellzahl/Roux-Flasche betrug 3,19 x 10^7 Zellen. Aus diesen Werten ist zu berechnen, welche CdR-Menge von einer Zelle - eine kontinuierliche Abbauleistung vorausgesetzt - innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde abgebaut würde:

$$\frac{6{,}25 \times 10^{-5}\,g \times 4}{2 \times 3{,}19 \times 10^{7}} = 3{,}94 \times 10^{-12}\,g$$

Stellt man diese Ergebnisse denen gegenüber, die bei der Untersuchung des fertigen Pyrimidinnukleosids TdR an HeLa-Zellen gewonnen wurden (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966), so zeigt sich, daß das CdR um ein Vielfaches rascher abgebaut wird als das TdR. Unter nahezu identischen Kulturbedingungen wurden ca. 0,5 /ug ^{3}H-TdR/ml verabreicht und dessen Abbau über eine Zeit von 48 Stunden verfolgt. Dabei erreichte die relative Aktivität des TdR 50 % des Ausgangswertes erst nach 6 Stunden.

Einleitend wurde darauf hingewiesen, daß das CdR nicht ausschließlich für die DNS, sondern auch für die RNS utilisiert wird (MÜLLER, 1966). Das Ausmaß der Verwer-

tung für die RNS hängt dabei von der Konzentration des Vorläufers im Medium sowie von der Dauer der Versuchszeit ab (MÜLLER und ROCKER, 1967). Nach Kenntnis der Abbauwege des CdR kann nun dazu Stellung genommen werden, welches der Abbau- bzw. Zwischenprodukte als unmittelbarer RNS-Vorläufer in Betracht kommt. Die Möglichkeit der unmittelbaren Utilisation des CdR wie des dCMP oder des UdR und dUMP für die RNS entfällt, wenn man die bereits von REICHARD und ESTBORN (1951) festgestellte Irreversibilität der Ribosereduktion voraussetzt.

MÜLLER (1966) vermutete, daß die Utilisation des CdR für die RNS durch die HeLa-Zellen über das Abbauprodukt Uracil erfolge. Diese Annahme findet ihre Bestätigung durch die vorliegenden Abbauversuche, bei denen das Uracil als Hauptabbauprodukt in Erscheinung trat. Eine Verwertung des Uracils für die RNS konnten bereits LEIBMANN und HEIDELBERGER (1955) mit 2-^{14}C-Uracil an Ratten und CANELLAKIS (1955) mit ^{14}C-Uracil an Rattengewebe in vitro nachweisen.

Eine Verwertung des allerdings in geringer Menge auftretenden Abbauproduktes Cytosin wäre bei der DNS-und RNS-Synthese denkbar. Jedoch ergaben Fütterungsversuche mit ^{15}N-markiertem Cytosin an Ratten, daß dieser Vorläufer nicht in die Nukleinsäuren eingebaut wird (BENDICH et al., 1949).

E. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Abbau des Desoxycytidins (CdR) durch HeLa-Zellen zu studieren sowie das Verhältnis zu bestimmen, wie das CdR für das DNS-Cytosin und das DNS-Thymin utilisiert wird.

In Roux-Flaschen gezüchteten HeLa-Zellen wurde ^{3}H-markiertes Desoxycytidin ^{3}H-CdR(G) in der Kulturflüssigkeit verabreicht und der Abbau dieser Substanz über einen Zeitraum von 8 Stunden verfolgt.

Die Auftrennung der Abbauprodukte erfolgte durch kombinierte Anwendung der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie. Durch die Messung der ^{3}H-Aktivität der isolierten Substanzen im Flüssigkeitsszintillationszähler wurden die relativen Aktivitäten des CdR und seiner Abbauprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 und 8 Stunden bestimmt. Ferner wurden die Gesamtaktivität und die nicht-flüchtige Aktivität des Kulturmediums untersucht und die gemessenen Werte auf ein konstantes

Volumen von 80 ml Medium (Ausgangsvolumen) und eine gleichbleibende Zellzahl (3,19 x 10^7/Roux-Flasche) bezogen.

Bei der Untersuchung des CdR-Abbaus wurden berücksichtigt: TMP, TdR, Thymin, dUMP, UdR, Uracil, dCMP, CdR, Cytosin und ß-Aminoisobuttersäure (BAIB). Als Hauptabbauprodukte erwiesen sich das Uracil und das UdR. In geringer Menge wurden Cytosin und TdR nachgewiesen; von Thymin und TMP sowie dCMP und dUMP waren nur Spuren zu finden.

Das CdR und seine Abbauprodukte zeigten in der achtstündigen Beobachtungszeit folgendes Verhalten: Die CdR-Konzentration nahm innerhalb von 15 Minuten um ca. 50 % ab; nach 2,5 Stunden war nur noch ca. 1 % der verabreichten CdR-Menge vorhanden. Als Hauptabbauprodukt trat zunächst die Uridindesoxyribose (UdR) auf, deren Anteil etwa 50 Minuten nach Versuchsbeginn mit ca. 40 % sein Maximum erreichte. Nach kontinuierlicher Abnahme betrug sein Anteil am Versuchsende etwa 6 %. Weniger schnell trat Uracil in der Kulturflüssigkeit auf, das mit 70 % am Versuchsende den

Hauptanteil sämtlicher Abbauprodukte stellte. Der Anteil des Cytosin betrug nach 40 Minuten knapp 8 %; mit etwa 5 % blieb sein Anteil bis zu Versuchsende nahezu konstant.

Zur Bestimmung des Verhältnisses, in dem CdR für DNS-CdR und DNS-TdR utilisiert wird, erfolgte die Inkubation von HeLa-Zellen in ^{3}H-CdR-haltigem Medium über eine Zeit von 5 Stunden. Die extrahierte DNS wurde enzymatisch mit DNase und Phosphodiesterase abgebaut. Nach der Auftrennung der Nukleotide dCMP und TMP mit der Hochspannungselektrophorese erfolgte die Bestimmung des Utilisationsverhältnisses durch Aktivitätsmessung. Dieses beträgt 1:1.

Die Verwertung des CdR für die Thymidylsäure vollzieht sich nach unseren Befunden wahrscheinlich vorwiegend auf dem Reaktionsweg CdR —— UdR —— dUMP —— TMP. Hierfür spricht das Auftreten großer Mengen von UdR als erstes Hauptabbauprodukt unmittelbar nach Inkubationsbeginn.

Die Hauptmenge des CdR wird rasch abgebaut. Der Abbauweg ist offenbar CdR —— UdR —— Uracil. Das Auftreten von Uracil bietet eine Erklärung für die in letzter Zeit nachgewiesene Utilisation des CdR für die RNS.

F. L I T E R A T U R

AMANO, M., B. MESSIER and C.P. LEBLOND: Specifity of labelled thymidine as a desoxyribonucleic acid precursor in radioautography. J. Histochem. Cytochem. 7, 153-155 (1958).

BENDICH, A., H. GETTLER and G.B. BROWN: A synthesis of isotopic cytosine and a study of its metabolism in the rat. J. Biol. Chem. 177, 563-570 (1949).

CANELLAKIS, E.S.: Some aspects of the metabolism in vitro of 2-^{14}C-labelled orotic acid, uracil, uridine and uridylic acid. Fed. Proc. 14, 324 (1955).

COHN, W.E.: Methods of isolation and characterization of mono- and polynucleotides by ion-exchange chromatography. In: Methods in enzymology. Vol. 3, 724-743 (1957). Hrsg. COLOWICK, S.P. und N.O. KAPLAN. Acad. Press, N. Y. (1957).

COOPER, E.H. and J.D. MILTON: The incorporation and degradation of pyrimidine DNA precursors by human leucocytes. Brit. J. Cancer 18, 701-713 (1964).

CRAMER, F.: Papierchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim (1958).

DISCHE, Z.: Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion. Mikrochemie 8, 4- 32 (1930).

FINK, K., R.E. CLINE, R.B. HENDERSON and R.M. FINK: Metabolism of 2-^{14}C-thymine or methyl-^{14}C-thymine by rat liver in vitro. J. Biol. Chem. 221, 425-433 (1956).

FRIEDKIN, M. and H. WOOD: Utilization of thymidine-C^{14} by bone marrow cells and isolated thymus nuclei. J. Biol. Chem. 220, 639-651 (1956).

HARBERS, E., G.F. DOMAGK und W. MÜLLER: Die Nukleinsäuren. Thieme Verlag, Stuttgart 1964.

HEIDELBERGER, C., E. HARBERS, K.C. LEIBMANN, Y. TAKAGI and V.R. POTTER: Specific incorporation of adenosine-5'-phosphate-^{32}P into ribonucleic acid in rat liver homogenates. Biochem. Biophys. Acta 20, 445-446 (1956).

HURST, R.O., J. LITTLE and G.C. BUTLER: The enzymatic degradation of thymonucleic acid. J. Biol. Chem. 188, 705-715 (1951).

JACQUEZ, J.A.: Transport and enzymatic splitting of pyrimidine nucleosides in Ehrlich cells. Biochem. Biophys. Acta 61, 265-277 (1962).

LANG, W., Ch. PILGRIM und W. MAURER: Prozentualer Anteil von ^{3}H- oder ^{14}C-Thymidin an der DNS-Synthese von Zellarten der Maus. Naturwissenschaften 53, 210 (1966).

LANG, W., D. MÜLLER and W. MAURER: Determination thymidine metabolism in HeLa cell cultures by a combined electrophoretic and paper chromatographic method. Exp. Cell Res. 44, 645-648 (1966).

LEIBMANN, K.C. and C. HEIDELBERGER: Incorporation of uracil-2-C^{14} into some normal resting, normal growing and neoplastic tissues in the rat. Fed. Proc. 14, 243 (1955).

LENNARTZ, K.J. und W. MAURER: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdoppelung und der Generationszeit beim Ehrlich-Ascitestumor der Maus durch Doppel-Markierung mit ^{14}C- und ^{3}H-Thymidin. Z. Zellforschung 63, 478-495 (1964).

MALEY, G.F. and F. MALEY: Nucleotide interconversions. 8. Thymidine-sparing effect on the utilization of de-cytidine by chick-embryo-mince. Biochem. Biophysic. Acta 68, 293-301 (1963).

MALEY, F. and G.F. MALEY: Nucleotide interconversions. 8. Activities of desoxycytidylate-deaminase and thymidylate-synthetase in normal rat liver and hepatomas. Canc. Res. 21, 1421-1426 (1961).

MARSH, J.C. and S. PERRY: Thymidine catabolism by normal and leucemic human leucocytes. J. clin. Invest. 43, 267-278 (1964).

MÜLLER, D.: Über den Einfluß von Desoxycytidin auf die Thymidin-Inkorporation von HeLa-Zellen (Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-TdR). Naturwissenschaften 53, 22-23 (1966).

MÜLLER, D.: Autoradiographische Untersuchungen an HeLa-Zellen über die Brauchbarkeit des ^{3}H-Desoxycytidin als spezifischer Vorläufer der Desoxyribonukleinsäure. Exp. Cell Res. 44, 627-631 (1966).

MÜLLER, D.: Untersuchungen des DNS-Gehaltes der HeLa-Zellen sowie der Teilphasen ihres Generationszyklus. In Vorbereitung.

MÜLLER, D. und H.-E. ROCKER: Untersuchungen zur Kinetik der Desoxycytidin-Inkorporation an HeLa-Zellen. In Vorbereitung.

RACHMELER, M., J. GERHARDT and J. ROSNER: Limited thymidine uptake in Escherichia Coli due to an inducible thymidine phosphorylase. Biochem. Biophys. Acta 49, 222-225 (1961).

REICHARD, P. and B. ESTBORN: Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. J. Biol. Chem. 188, 839-846 (1951).

REICHARD P.: The biosynthesis of deoxyribonucleic acid by the chick embryo. I. Utilization of cytidine-C^{14}. J. Biol. Chem. 234, 1244-1248 (1959).

SCHNEIDER, W.C.: Phosphores compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem. 161, 293-303 (1945).

SCHNEIDER, W.C. and J. ROTHERHAM: Some studies of the metabolism of deoxycytidine-2-C^{14} by hepatoma cells. J. Biol. Chem. 236, 2764-2767 (1961).

STEWART, P.A., H. QUASTLER, M.R. SKOUGAARD, D.R. WIMBER, M.F. WOLFSBERG, C.A. PERROTTA, B. FERBEL and M. CORLOUGH: Four-factor model analysis of thymidine incorporation into mouse DNA and the mechanism of radiation effects. Radiation Res. (N.Y.) 24, 521-537 (1965).

TAYLOR, H.: Autoradiography with tritium-labelled substances. Advances in Biol. and Med. Physics 7, 107-130 (1960).

TAYLOR, H.: Asynchronous duplication of chromosoms in cultured cells of Chines Hamster. J. biophys. and biochem. Cytol. 7, 455-463 (1960).

ZAJICEK, G., N. BERNSTEIN, A. ROSIN and J. GROSS: Studies on the in vitro incorporation of tritiated thymidine into ascites tumor cells. Exp. Cell Res. 31, 390-396 (1963).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in:

Hamburg: Bautzmann, Bettendorf, Burchard, Fleischhauer, Gattermann, Harmsen, Heyns, Horstmann, Kosswig, Krauspe, Kuhlencordt, Kühnau, Lichtenthäler, Lierse, Maaß, Mevius, Nast, Neuert, Reichel, Roemer, Wartenberg;

Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Dölle, du Mesnil de Rochemont, Exner, Gedigk, Hamm, Heuser, Hildebrandt, Jacob, Linneweh, Löhr, Lübbers, Martini, Marx, Neubauer, Petzoldt, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmid, Schlosser, Schwaiger, Siegert, Siess, Straub, Würtele.

L e b e n s l a u f

Am 23.4.1941 wurde ich als vierter Sohn des Mittelschullehrers Kurt Rathenberg und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Kannappel, in Königsberg/Pr. geboren. Im Januar 1945 fiel mein Vater. Kurz darauf flüchteten wir aus Ostpreußen.

1947 wurde ich in Wischuer/Mecklenburg eingeschult. 1949 verließen wir die Sowjetzone und wohnen seitdem in Warburg/Westf. Am 3. März 1962 bestand ich hier am Humanistischen Gymnasium das Abitur.

Im Sommersemester 1962 begann ich mein Medizinstudium in Hamburg. Im April 1963 bestand ich dort das Vorphysikum und im August 1964 die ärztliche Vorprüfung.

Seit dem Sommersemester 1965 studiere ich an der Philipps-Universität in Marburg und habe hier am 9.1.1968 das Staatsexamen bestanden.

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert
danke ich für die Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse an der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. D. Müller
für die Anleitung zur experimentellen Arbeit und seine ständige Hilfsbereitschaft.